

A2

2/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009909713

WPI Acc No: 1994-177419/ 199422

XRAM Acc No: C94-081134

**Stromal cell lines from human bone marrow cells - contain SV-40 DNA with defective origin of replication, useful as feeder cells, for prodn. of growth factors and for gene expression**

Patent Assignee: GSF-FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEI (GSFU-N); GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEI (GSFU-N)

Inventor: DORMER P; THALMEIER K; DOERMER P; DOERNER P

Number of Countries: 031 Number of Patents: 019

Patent Family:

| Patent No   | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|-------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| DE 4322570  | C1   | 19940616 | DE 4322570  | A    | 19930707 | 199422 B |
| WO 9502039  | A1   | 19950119 | WO 94EP1780 | A    | 19940601 | 199509   |
| WO 9502040  | A2   | 19950119 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 199509   |
| AU 9474914  | A    | 19950206 | AU 9474914  | A    | 19940707 | 199518   |
| NO 9600050  | A    | 19960105 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 199612   |
|             |      |          | NO 9650     | A    | 19960105 |          |
| FI 9600064  | A    | 19960105 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 199613   |
|             |      |          | FI 9664     | A    | 19960105 |          |
| EP 707634   | A1   | 19960424 | EP 94924721 | A    | 19940707 | 199621   |
|             |      |          | WO 94EP2224 | A    | 19940707 |          |
| CZ 9600056  | A3   | 19960717 | CZ 9656     | A    | 19940707 | 199637   |
| HU 73380    | T    | 19960729 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 199643   |
|             |      |          | HU 953653   | A    | 19940707 |          |
| JP 8508413  | W    | 19960910 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 199704   |
|             |      |          | JP 95503827 | A    | 19940707 |          |
| US 5658761  | A    | 19970819 | US 96584425 | A    | 19960111 | 199739   |
| CN 1126489  | A    | 19960710 | CN 94192694 | A    | 19940707 | 199749   |
| AU 686218   | B    | 19980205 | AU 9474914  | A    | 19940707 | 199813   |
| CZ 284871   | B6   | 19990317 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 199917   |
|             |      |          | CZ 9656     | A    | 19940707 |          |
| CA 2166707  | C    | 19990330 | CA 2166707  | A    | 19940707 | 199931   |
| JP 3068195  | B2   | 20000724 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 200040   |
|             |      |          | JP 95503827 | A    | 19940707 |          |
| EP 707634   | B1   | 20001206 | EP 94924721 | A    | 19940707 | 200064   |
|             |      |          | WO 94EP2224 | A    | 19940707 |          |
| DE 69426389 | E    | 20010111 | DE 626389   | A    | 19940707 | 200110   |
|             |      |          | EP 94924721 | A    | 19940707 |          |
|             |      |          | WO 94EP2224 | A    | 19940707 |          |
| HU 218854   | B    | 20001228 | WO 94EP2224 | A    | 19940707 | 200111   |
|             |      |          | HU 953653   | A    | 19940707 |          |

Priority Applications (No Type Date): DE 4322570 A 19930707

Cited Patents: 8.Jnl.Ref; JP 60204719

Patent Details:

| Patent No  | Kind | Lan | Pg | Main IPC    | Filing Notes  |
|------------|------|-----|----|-------------|---|
| DE 4322570 | C1   |     | 4  | C12N-005/08 |   |
| WO 9502039 | A1   | G   | 13 | C12N-005/10 |   |
|            |      |     |    |             | Designated States (National): CA US   |
|            |      |     |    |             | Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE |
| WO 9502040 | A2   | E   | 37 | C12N-005/10 |   |
|            |      |     |    |             | Designated States (National): AU CA CN CZ FI HU JP KR LV NO NZ PL RU US       |
|            |      |     |    |             | Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE |
| AU 9474914 | A    |     |    | C12N-005/10 | Based on patent WO 9502040  |



|   |      |    |             |  |
|---|------|----|-------------|--|
| NO 9600050  | A    |    | C12N-005/08 |  |
| FI 9600064  | A    |    | C12N-000/00 |  |
| EP 707634   | A1 E |    | C12N-005/10 | Based on patent WO 9502040                                     |
| Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE |      |    |             |  |
| CZ 9600056  | A3   |    | C12N-005/10 |  |
| HU 73380  | T    |    | C12N-005/10 | Based on patent WO 9502040                                     |
| JP 8508413  | W    | 40 | C12N-005/10 | Based on patent WO 9502040                                     |
| US 5658761  | A    | 17 | C12N-005/10 |  |
| CN 1126489  | A    |    | C12N-005/10 |  |
| AU 686218   | B    |    | C12N-005/10 | Previous Publ. patent AU 9474914<br>Based on patent WO 9502040 |
| CZ 284871   | B6   |    | C12N-005/10 | Previous Publ. patent CZ 9600056<br>Based on patent WO 9502040 |
| CA 2166707  | C    |    | C12N-013/00 |  |
| JP 3068195  | B2   | 16 | C12N-005/10 | Previous Publ. patent JP 8508413<br>Based on patent WO 9502040 |
| EP 707634   | B1 E |    | C12N-005/10 | Based on patent WO 9502040                                     |
| Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE |      |    |             |  |
| DE 69426389   | E    |    | C12N-005/10 | Based on patent EP 707634<br>Based on patent WO 9502040        |
| HU 218854   | B    |    | C12N-005/10 | Previous Publ. patent HU 73380<br>Based on patent WO 9502040   |

Abstract (Basic): DE 4322570 C

New stromal cell line from human bone marrow contains in its genome DNA sequences from Simian virus (SV)-40 having a defective origin of replication.

Partic. a part of the late SV-40 gene encoding the coat protein is deleted, and the virus sequences contain at least a region encoding the T-antigen.

Specified cell lines have been deposited as DSm ACC 2055 and 2056.

USE/ADVANTAGE - The cell lines are used (1) as feeder layers of haematopoietic cells and osteoclast precursors (e.g. for analysing the effects of drugs on malignant bone marrow cells from leukaemia patients), (2) for prodn. of growth factors (G-CSF and IL-6) and (3) for expressing genes, cloned in vectors which replicate under control of the large T-antigen of SV-40. Because the origin of replication is defective, spontaneous changes in the cell line caused by virus prodn. cannot occur. Unlike prim. stroma, these cell lines have a precisely defined, uniform cell population not subject to experimental variation. They are capable of unlimited division, remain adherent after irradiation and produce large amts. of growth factors (controllable by irradiation or stimulation with interleukin-1).

Dwg.0/2

Title Terms: STROMA; CELL; LINE; HUMAN; BONE; MARROW; CELL; CONTAIN; SV; DNA; DEFECT; ORIGIN; REPLIC; USEFUL; FEED; CELL; PRODUCE; GROWTH; FACTOR; GENE; EXPRESS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-000/00; C12N-005/08; C12N-005/10; C12N-013/00

International Patent Class (Additional): A61K-035/66; C12N-005/02; C12N-007/00; C12N-015/01; C12N-015/09; C12N-015/66; C12N-015/79; C12P-021/00; C12P-021/02; C12R-001-91

File Segment: CPI





⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Patentschrift**  
⑩ **DE 43 22 570 C 1**

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 N 5/08**  
C 12 N 7/00  
C 12 N 15/79  
A 61 K 35/68

⑳ Aktenzeichen: P 43 22 570.5-41  
㉑ Anmeldetag: 7. 7. 93  
㉒ Offenlegungstag: —  
㉓ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 16. 6. 94

**DE 43 22 570 C 1**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉔ **Patentinhaber:**

GSF - Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit, GmbH, 80807 München, DE

㉕ **Erfinder:**

Thalmeier, Karin, Dr., 81475 München, DE; Dörmer,  
Peter, Prof. Dr., 82205 Gilching, DE

㉖ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:**

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, S. 3477-3480, 1985;

㉗ **Stromale Zelllinien aus menschlichem Knochenmark**

㉘ Die Erfindung betrifft stromale Zelllinien aus menschlichem Knochenmark, welche in ihrem Genom virale DNA Sequenzen des Simian Virus 40 (SV 40) enthalten. Aufgabe der Erfindung ist es, Zelllinien bereitzustellen, wobei spontane Veränderungen der Zelllinien durch Virusproduktion ausgeschlossen sind. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß der Replikationsursprung des SV-40-Virus defekt ist.

**DE 43 22 570 C 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft stromale Zelllinien nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1.

Menschliches Knochenmark kann in vitro maximal 20 Wochen kultiviert werden. Es ist dabei auf die Funktion von Feederzellen angewiesen, die gleichfalls aus dem Knochenmark gewonnen werden. Die Interaktion zwischen Knochenmarkzellen und Feederzellen ist weitgehend unerforscht, stellt aber mit großer Wahrscheinlichkeit den Schlüssel zu einer erfolgreichen Langzeitkultivierung dar. Sowohl die Gewinnung als auch die Analyse primärer Feederzellen aus Knochenmark stellt hierbei ein beträchtliches technisches Problem dar, da diese Zellen

- aufgrund ihrer langen Verdoppelungszeit und des folglich extrem langsamen Wachstums nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehen;
- aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer (Zelltod nach ca. 30 Zellteilungen) für Langzeitversuche und Versuchsreihen untauglich sind;
- ein Gemisch aus unterschiedlichen Zelltypen darstellen, so daß eine Einzelkomponentenanalyse nicht durchgeführt werden kann;
- keine Kontakthemmung zeigen, also zum Wachstumsarrest bestrahlt werden müssen.

Aus Harigaya K, Hiroshi H: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3477—3480, 1985 ist bekannt die Transfektion von menschlichen Knochenmarkzellen mit einem Replikationskompetenten SV-40 Konstrukt mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation durchzuführen.

Wegen des intakten Replikationsursprungs und der intakten späten Gene besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit störender spontaner Virusproduktion.

Des weiteren ist aus Singer Jw, Charbord P, Keating A, Nemunaitis J, Raugi G, Wight TN, Lopez JA, Roth GJ, Dow LW, Fialkow PJ: Blood 70: 464—474, 1987, bekannt die DNA eines Wildtyp SV-40-Virus durch Infektion in das zelluläre Genom der Knochenmarkzellen einzuschleusen. Aus den so veränderten Zellen lassen sich jedoch keine permanenten Zelllinien ableiten.

Aufgabe der Erfindung ist es, Zelllinien der e. g. Art bereitzustellen, wobei spontane Veränderungen der Zelllinien durch Virusproduktion ausgeschlossen sind.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1.

Die Unteransprüche 2 bis 5 beschreiben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung. Die übrigen Ansprüche zeigen wichtige Verwendungen der beanspruchten Zelllinien auf.

Die beanspruchten Zelllinien weisen im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen humanen Knochenmarkstromazelllinien folgende Vorteile auf.

## a) Homogenität

Die Zelllinien bestehen im Unterschied zu primärem Stroma aus einer genau definierten einheitlichen Zellpopulation. Experimentelle Schwankungen, die bei Verwendung von primären Zellen aus wechselnden Probanden auftreten, sind somit ausgeschlossen;

## b) Permanenz

Primäre stromale Zellen und die meisten SV-40-immortalisierten Zelllinien sterben nach einer begrenzten

Anzahl von Teilungen ab. Die beanspruchten stromalen Linien sind unbegrenzt teilungsfähig.

## c) Wachstumsarrest durch Bestrahlung

Für Experimente, in denen die stromalen Zellen als "Feeder-Layer" (=Fütterzellen) für hämopoetische Progenitoren verwendet werden, müssen sie in ihrem Wachstum arretiert werden und gleichzeitig an der Zellkulturschale haften bleiben. Bislang beschriebene SV-40-immortalisierte Linien lösen sich nach Bestrahlung von ihrer Unterlage ab, während die beanspruchten Zelllinien sowohl das Wachstum einstellen als auch adhären bleiben.

## d) Produktion von hämopoetischen Wachstumsfaktoren

Feederzellen für hämopoetische Vorläuferzellen steuern deren Wachstum und Differenzierung u. a. durch die Produktion von Wachstumsfaktoren. Die beanspruchten Zelllinien sind in der Lage, große Mengen dieser Wachstumsfaktoren zu produzieren, wobei die Faktorproduktion sowohl durch Bestrahlung als auch durch Stimulation mit Interleukin 1 beeinflusst werden kann.

Die Erfindung wird im folgenden anhand zweier Ausführungsbeispiele mit Hilfe der Fig. 1 und 2 näher erläutert. Dabei zeigen die beiden Figuren die Clone Charts der verwendeten SV-40 Plasmidvektoren.

Andere Vektoren, welche mindestens die viralen DNA Sequenzen des Simian Virus 40 enthalten, die für das T Antigen kodieren und für die der Replikationsursprung des SV-40 Virus defekt ist, können ebenfalls benutzt werden. Geeignet sind auch solche Vektoren, bei denen zusätzlich die späten Gene des SV-40 Virus, welche für die Hüllproteine kodieren deletiert sind.

Primäre adhären Zellen aus menschlichem Knochenmark wurden mit Hilfe eines solchen SV-40-Plasmidvektors transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Liposomen. Die im Verlauf der Lipofektion transfizierte DNA gelangt in den Zellkern der Knochenmarkzellen und integriert dort in die chromosomale DNA. Die Integrationsstelle des Vektors ist hierbei nicht vorhersehbar, geschieht also zufällig. Die Expression des in das zelluläre Genom integrierten SV-40 T Antigens bewirkt eine Immortalisierung dieser Zellen.

Die so etablierten Linien sind immortalisiert, zeigen sehr kurze Verdoppelungszeiten und bilden eine homogene Zellpopulation.

Die Fig. 1 zeigt einen benutzten Transfektionsvektor (pSV IN-1), wie er aus Cohen et al., 1984 J. Virol. 51 591—96 bekannt ist.

Die Fig. 2 zeigt einen daraus ableitbaren zweiten Vektor (pUC IN-1 wt). Dabei wurde SV40-DNA aus pSVIN-1 an den Schnittstellen Bam/Pst geschnitten und die Nukleotidsequenzen von bp 1988—2533 entfernt. Dann die deletierte SV40-DNA in pUC 12 Bam/Pst Schnittstelle inkliniert.

Die benutzten Vektoren pUC 12 und pBR 322 sowie die viralen DNA Sequenzen des Simian Virus 40 sind kommerziell erhältlich.

Bei der Transfektion der Knochenmarkszellen wurde wie folgt verfahren:

Knochenmarkszellen wurden für 2—3 Wochen in Langzeitkulturmedium [McCoy's 5a angereichert mit 12,5% fötalem Kälberserum, 12,5% Pferdeserum, 1% Natriumbicarbonat, 1% MEM nichtessentielle Aminosäurelösung, 1% L-Glutamin (200 mM), 1% Penicillin/

Streptomycinlösung —  $10^{-6}$ M  $\alpha$ -Thioglycerol,  $10^{-6}$ M Hydrocortison] gezüchtet (5 CO<sub>2</sub>; 37°C) bis der stromale Layer subkonfluent war. Einen Tag vor der Transfektion wurden die adhärensten stromalen Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst und in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausplatziert. Die Transfektion wurde mit cäsiumchloridgeeigneter Plasmid DNA [pSV-IN1 und pUCIN-1wt] durchgeführt.

Die Transfektion wurde wie folgt entsprechend dem Transfektionsprotokoll der Firma Serva [IBF instruction sheet No. 294210] durchgeführt.

Die semikonfluenten Zellen wurden einmal mit PBS, einmal mit McCoy's 5a-Medium gewaschen und fünf bis 18 Stunden mit einer frisch hergestellten Plasmid/Transfectam-Mischung in 8 ml serumfreiem Langzeitkultur-Medium in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen inkubiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen 2 × mit PBS/10% FCS gewaschen und in LTC-Medium kultiviert bis sie konfluent waren. Die transfizierten Zellen wurden durch wiederholtes Passagieren des stromalen Layers im Verhältnis 1 : 2 selektioniert. Nach ca. 25–30 Passagen erreichten die immortalisierten Zellen eine sog. Wachstumskrise. Diese Krise wurde überwunden indem Zellen, die sich sehr langsam bzw. gar nicht teilten, von ihrer Unterlage durch Trypsinbehandlung abgelöst und in eine neue Kulturflasche überführt wurden. Derart behandelte Zellen erhielten sich spontan aus der Krise und zeigten einen immortalisierten Phänotyp.

Zwei der so erhaltenen Zelllinien wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH hinterlegt. Dabei hat die Kultur mit der Eintragsnummer DSM ACC2055 die interne Nummer L87/4 und die Kultur mit der Eintragsnummer DSM ACC2056 die interne Nummer L88/5.

Die hinterlegten stromalen Zelllinien L87/4 und L88/5 unterscheiden sich in folgenden Eigenschaften:

- Expression des T-Antigens:  
L87/4: geringe Expression (Passage 14)  
L88/5: starke Expression (Passage 14)
- Integrationsort der viralen DNA:  
unterschiedliche Integrationsstellen im Genom
- Konstitutive Faktorproduktion:  
L88/4: konstitutive Produktion von G-CSF und IL-6  
L88/5: geringe konstitutive Produktion von G-CSF und IL-6.

Die Produktion von G-CSF und IL-6 ist in beiden Zelllinien durch Bestrahlung induzierbar.

Im folgenden werden einige wichtige Anwendungsbeispiele für die Verwendung der Zelllinien genannt.

Die stromalen Zelllinien L87/4 und L88/5 können für alle Experimente verwendet werden, in denen Zellen gezüchtet werden sollen, die in Abhängigkeit von einem Feeder-Layer wachsen. Dies sind sowohl alle hämopoetischen Vorläufer- bzw. Stammzellen als Vorläuferzellen der Knochenbildung (Osteoklasten). Positive experimentelle Ergebnisse liegen bereits für das Wachstum früher feeder-abhängiger B-Tumorzellen (BL70) auf der Linie L88/5 sowie der Linie L87/4 vor.

Neben der Kultivierung normaler hämopoetischer Vorläuferzellen können die Linien L87/4 und L88/5 auch für die Analyse maligner Knochenmarkzellen aus Leukämiepatienten (CML, AML, ALL) unter Medikamenteneinfluß verwendet werden, was im Hinblick auf die autologe Knochenmarktransplantation von besonderer Bedeutung ist. Experimentelle Schwankungen, die

bislang aufgrund der Verwendung primärer Feederzellen aus unterschiedlichen Probanden auftraten, sind hierbei auszuschließen.

Neben ihrer Eignung als Feederzellen können die Linien L87/4 und L88/5 als Producerlinien für eine Reihe von Wachstumsfaktoren verwendet werden. Bedeutung könnte hierbei die extrem hohe konstitutive Produktion von G-CSF der Linie L87/4 bzw. IL-6 der Linie L88/5 erlangen. Gezeigt werden konnte ferner eine bislang nicht definierte stark stimulierende Aktivität auf das Zellwachstum von 7TD1- bzw. NFS60-Zellen im konditionierten Medium (= Zellkulturüberstand) von L88/5-Zellen.

Die Verwendung als Expressionszelllinie für Gene die in Vektoren kloniert sind die unter Kontrolle des großen T-Ag von SV40 replizieren ist ebenfalls möglich. Als Beispiel seien hier COS-Zellen genannt.

#### Patentansprüche

1. Stromale Zelllinie aus menschlichem Knochenmark, welche in ihrem Genom virale DNA Sequenzen des Simian Virus 40 (SV-40) enthält, dadurch gekennzeichnet, daß der Replikationsursprung des SV-40-Virus defekt ist.
2. Stromale Zelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Teil der späten SV-40-Gene, welche für die Hüllproteine kodieren deletiert ist.
3. Stromale Zelllinie nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die viralen DNA Sequenzen des Simian Virus 40 mindestens die Bereiche enthalten, die für das T Antigen kodieren.
4. Stromale Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wie sie unter der Eintragsnummer DSM ACC2055 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH hinterlegt ist.
5. Stromale Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wie sie unter der Eintragsnummer DSM ACC2056 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH hinterlegt ist.
6. Verwendung einer stromalen Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Feeder Layer für hämopoetische Zellen oder Osteoklastenvorläufer.
7. Verwendung einer stromalen Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Produktion von Wachstumsfaktoren.
8. Verwendung einer stromalen Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Expressionszelllinie für Gene, die in Vektoren kloniert sind, die unter Kontrolle des großen T-Antigens von SV-40 replizieren.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

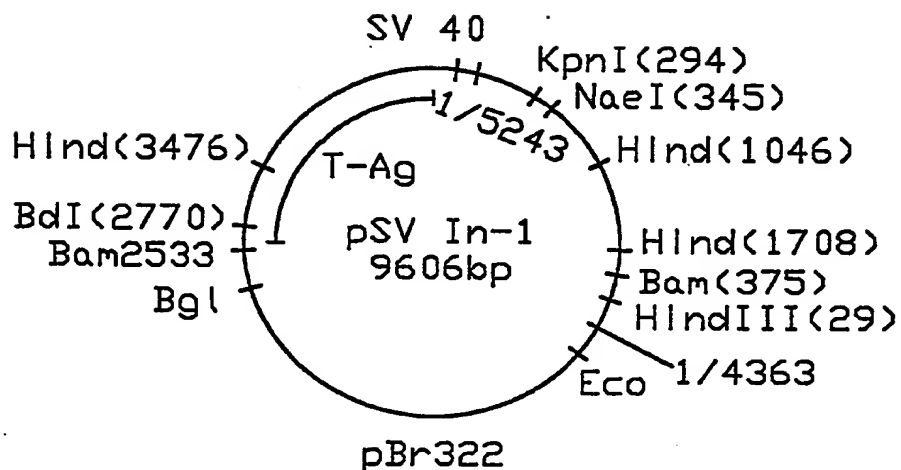


Fig. 2

